

## カンアオイ (*Asarum nipponicum* F. Maekawa) 葉身の斑点から分離された *Pyricularia* 属菌

生 井 恒 雄・藤 田 与 一\*

山形大学農学部生物生産学科生産生態制御学講座 現在：\*新潟県上越農業改良普及センター  
(平成18年10月2日受理)

*Pyricularia* sp. isolated from a leaf lesion of  
Kan-aoi plant, *Asarum nipponicum*

Tsuneo NAMAI and Yoichi FUJITA\*

Section of Agricultural Ecology and Engineering, Department of Bioproduction,  
Yamagata University, Tsuruoka 997-8555, Japan

\*Present address: Jouetsu Agricultural Extension  
Center, Niigata Prefecture, Jouetsu 943-0153, Japan  
(Received October. 2. 2006)

### Summary

A *Pyricularia* sp.-type fungus was isolated from leaf lesion of *Kan-aoi* plant (*Asarum nipponicum* F. Maekawa) grown in the forest near a paddy field in Tsuruoka (Haguro-machi), Yamagata Prefecture. The isolate grew gray mycelia with aerial hyphae on potato sucrose agar medium. The conidium formed rarely on oatmeal agar medium and showed typical shape of *Pyricularia* species, obclavate, bi-septate, tapering at the apex, and with a short tooth at the base. The length and width of the conidium was close to the *Pyricularia* species isolated from many gramineous plants. The phytotoxins of the isolate produced in the culture filtrate on soy-sauce medium were differed from those of the rice isolate or crabgrass isolate. However, although the isolate appeared as clear bands on agarose gel in *Pot2* rep-PCR DNA fingerprinting like a typically *Pyricularia* species, the fungus was identified an unknown *Pyricularia* species.

**Key words:** A *Pyricularia* sp.-type fungus, leaf lesion on *Kan-aoi* plant (*Asarum nipponicum* F. Maekawa)

### 緒 言

イネのいもち病はイネいもち病菌 *Pyricularia grisea* により引き起こされるわが国の最重要病害の一つである。現在、我が国では政策的に環境保全型農業が推進されており、本病においても化学薬剤の削減による防除が重要課題となっている。有効な減農薬の防除法を確立するためには本菌の第一次伝染源の確定や、伝染経路の詳細な

把握が不可欠である。

近年、稲の機械移植技術の普及により育苗方法が変化したことから、前年度の罹病種子由来の罹病苗が本菌の主な第一次伝染源となったとされている(吉野, 1987)。しかし、イネいもち病菌はイネ以外の植物も宿主とするところから、それらの宿主植物における野外での越冬の可能性も否定できない(八重樫, 1987)。また、過去にイネに病原性を持ついもち病菌が分離された野外植物の

例としてタケ・ササ類が知られている（糸井ら，1978）が，庄内地方においては，タケ・ササ葉でのいもち病菌の存在は一般的ではない（生井・藤田，2004）。

庄内地方は冬季の多雪地帯であり，積雪下におけるいもち病菌の越冬は考えられない（堤，2004）．しかしながら庄内地方南部の水田には本病常発水田が存在し，毎年いもち病が発生するが，その周辺では田植え前からいもち病菌の分生孢子が飛散することも確認されている（柳澤，2002）．そこで，本研究ではイネいもち病常発水田周辺におけるいもち病菌のイネ以外の植物における越冬源の探索を目的に，水田周辺に自生している常緑植物を中心にその葉身に形成されていた病斑を探索した（生井・藤田，2004）．その結果，カンアオイ（*Asarum nipponicum* F. Maekawa）の葉身に形成されていた灰褐色の斑点から組織分離した糸状菌の中に，*Pyricularia* 属菌とみられる糸状菌を検出した．カンアオイからの *Pyricularia* 属菌の分離はこれまで未報告であるため，その概要を報告する．

#### 材料および方法

##### 採集・分離，培養

2002年5月山形県東田川郡羽黒町手向地内のいもち病常発水田周辺の杉林の林床に自生するカンアオイ（*Asarum nipponicum* F. Maekawa）で，前年の展開葉に斑点を形成している葉身（図1）を採集し，温室条件で25℃，連続光照射条件に静置して病斑上に分生孢子形成を促した．その結果，分生孢子は全く形成されなかった．そこで分離法を単孢子分離から常法の組織分離に切り替え，分離菌をPSA培地（ジャガイモ煎汁蔗糖寒天培地）上に保存した．分離菌は古田ら（1967）のいもち病菌の分生孢子形成法に従いオートミール培地を用いて行い，孢子の形状を光学顕微鏡で観察した．

同時にカンアオイの葉身上の病斑におけるこのような糸状菌が普遍的に存在するかを確認するため，2003年，最初の分離場所とは別の複数地点に生息するカンアオイについて観察し，葉身上の病斑から組織分離し，前述と同様に分離菌の栄養菌糸の形状を観察した．

##### 病原性試験・再分離

手向からのカンアオイ分離菌株を用いてイネおよびカンアオイに対する病原性と感染性の試験を行った．イネ

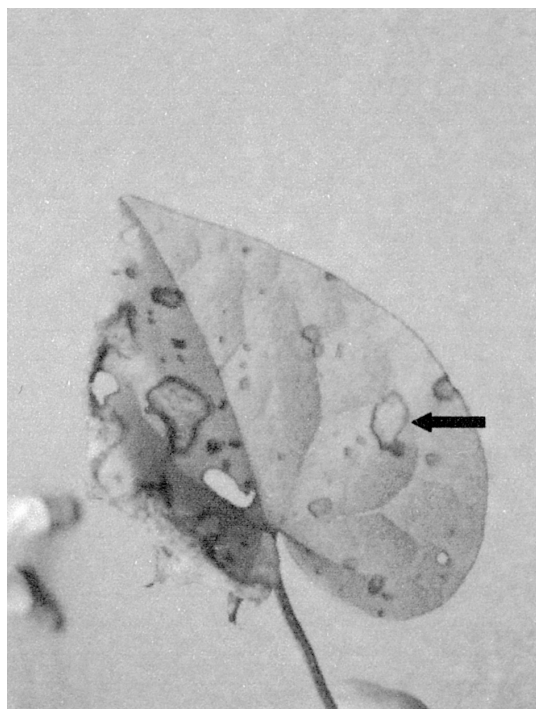


図1．カンアオイの葉身に見られる灰褐色の病斑（矢印）

品種は‘蒙古稻’で，シードリングケース（5 x 15 x 10 cm）を用い本研究室慣行で栽培した6葉期の幼苗を，カンアオイは野外に自生しているものを掘り起こして鉢に移植し，その葉身を用いた．接種は人工培地上で分生孢子がほとんど形成されなかったため，いもち病菌付傷接種用のパンチ機により付傷させた葉の上に，PSA培地上で培養した菌叢の含菌寒天を貼り付けて行った．接種後，飽和湿度，25℃の接種箱に24時間保持したあと，ガラス室に移し10日目に観察した．病原性の試験は病斑の形成を観察し，再分離に関しては接種15日目に接種部から組織分離による分離を行った．なお，本研究室保存のイネいもち病菌（Yu92-TK-P）も比較対照のため用いた．

##### 培地内に生産する毒素成分の解析

手向からの分離菌について毒素成分を，貫名（1998）の方法により検討した．すなわち，供試菌株を醤油・砂糖培地に移植し，25℃，暗黒下で10日間振とう培養した．培養ろ液を酢酸エチルにより抽出し，濃縮後シリカゲル薄層クロマトグラフィーにより解析した．展開剤として

メタノール：クロロホルム＝10：1を用いた。比較対照のためイネいもち病菌の毒素についても検討した。

#### *Pot2* rep-PCR フィンガープリンティング

手向からのカンアオイ分離株を用い、M. L. C. Georgeら (1998) の方法に準じ、*Pyricularia* 属菌の染色体上に挿入されている転移因子の一つである *Pot2* をプライマーとしてPCRフィンガープリント法により解析を行った。すなわち、栄養菌糸からのDNA抽出は以下に行った。供試菌株をPS培地(ジャガイモ煎汁蔗糖培地)で25℃、72時間振とう培養し、生育した栄養菌糸体200～500mgをキムワイブでろ過して集めた。菌糸体を20～50mgを500  $\mu$ lの50mM EDTE・0.2%SDS (pH7.5) 中で磨碎し、68℃、10分間保温したあと、23,400rpm、5分間遠心分離し、上清に60  $\mu$ lの4M酢酸カリウム (pH4.2) を加え攪拌し、ただちに氷中で5分間保持した。その後、遠心分離し、上清に600  $\mu$ lのイソプロパノールを加え攪拌した。静置後、5分間遠心分離し、沈殿部に70%エタノールを加え攪拌した後、遠心分離して粗核酸を得、風乾して保存した。次にRNAの分解とタンパク質の除去を行った。すなわち、滅菌蒸留水200  $\mu$ lで懸濁し、RNaseA溶液 (10mg/1 ml) 5  $\mu$ lを加え、37℃、30分間処理してRNAを分解した。さらに平衡化中性フェノール200  $\mu$ lを加え、混合後2分間遠心分離した。上清にクロロホルム200  $\mu$ l加えて遠心分離後、上清を得た。*Pot2* rep-PCRフィンガープリンティングに関しては、プライマーとして *Pot2-1* (5'-CGGAAGCCTAAGCTGTTT-3') と *Pot2-2* (5'-CCCTCATTCGTCACACGTTC-3') (Takara) を用いた。酵素処理はEXtaq ポリメラーゼ (Takara) を用いて行なった。サーマルサイクラー (Gene Amp PCR : System 2700) での反応条件は、最初の4サイクルは、熱変性 (94℃、1分)、アニーリング (62℃、1分)、伸長反応 (65℃、10分)、続く26サイクルは熱変性 (94℃、30秒)、アニーリング (62℃、1分)、伸長反応 (65℃、10分) で、最後の伸長反応は15分間行なった。PCR産物は1.0%アガロース電気泳動にかけ、紫外線下で写真撮影した。対照としてイネいもち病菌についても同様に検討した。

## 結 果

#### 分離菌の栄養菌糸の状況、分生胞子の形状

手向からのカンアオイ分離菌は、P S A培地上で、灰

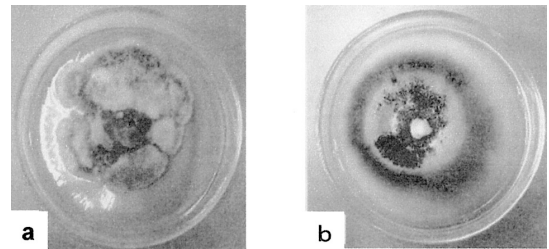


図2. カンアオイからの分離菌のPSA培地上の菌叢  
a : カンアオイ分離菌, b : イネいもち病菌(対照)

色の気中菌糸を有する菌叢を形成した(図2-a)が、イネいもち病菌のそれ(図2-b)と比較するとコロニー周縁が円状にスムーズに伸長せず先端が膨れ上がるような形状になった。この菌株をオートミール培地で培養し胞子形成を促した。その結果、きわめてまれに分生胞子が認められた。この胞子は2隔膜を持つ3細胞、洋ナシ形で先端が尖り、その基部には菌形の着生痕を持ち、長径、短径ともイネいもち病菌はじめ各種植物から分離した *Pyricularia* 属菌の分生胞子とほぼ同様の大きさの範囲であった(図3-a)。また、黄金地区に自生していたカンアオイ葉身の病斑から組織分離を行った結果、同様の糸状菌が分離され、この場合もきわめてまれに人工培地上で分生胞子が形成され、その形状、大きさともほぼ一致した(図3-b)。

#### 病原性、再分離試験

手向からのカンアオイ分離菌株は、イネ、カンアオイの葉身ともに接種時にできた付傷痕を越えて病斑を形成しなかった。また、対照としたイネいもち病菌もカンア

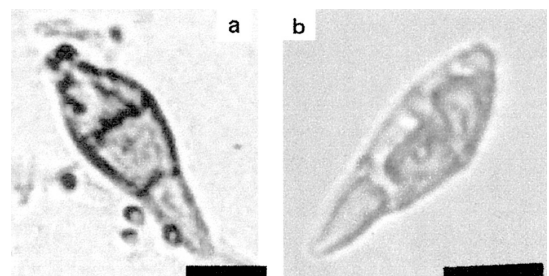


図3. カンアオイからの分離菌の培地上で形成された分生胞子

a : カンアオイ分離菌 (手向), b : カンアオイ分離菌 (黄金)

写真 a, b のバーは10  $\mu$ m

表1. カンアオイ分離菌のカンアオイとイネに対する病原性と再分離

供 試 菌 株	病 原 性		再 分 離	
	カンアオイ	蒙古稻	カンアオイ	蒙古稻
カンアオイ分離菌	—	—	+	+
イネいもち病菌（対照）	—	+	—	+

オイには病変を起こさなかったが、‘蒙古稻’の葉身には明らかに病斑を形成した。そこで、接種後15日目に接種部位を含む葉組織を常法により再び組織分離したところ、カンアオイ菌はイネおよびカンアオイの葉の接種部から、接種したのと同様の糸状菌が再分離された。しかし、イネいもち病菌はイネの葉身の接種部からは再分離できたが、カンアオイからは再分離できなかった（表1）。

#### 毒素成分の解析

本分離菌はイネいもち病菌が分泌するジヒドロピリキュロールと同じRf値に何らのスポットも見られなかった。しかし、ピリキュロールより多少Rf値が高い位置に薄

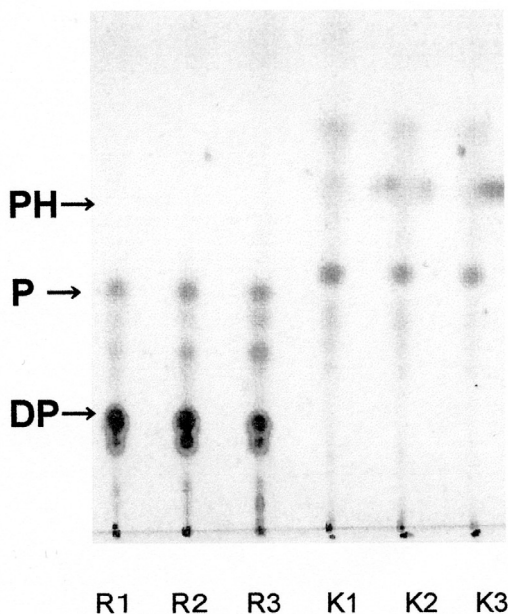


図4. カンアオイ分離菌の毒素成分のTLCパターン  
R1, R2, R3: イネいもち病菌（対照）  
K1, K2, K3: カンアオイ分離菌（手向）  
P: ピリキュロール, DP: ジヒドロピリキュロール  
PH: ピリカラシンH

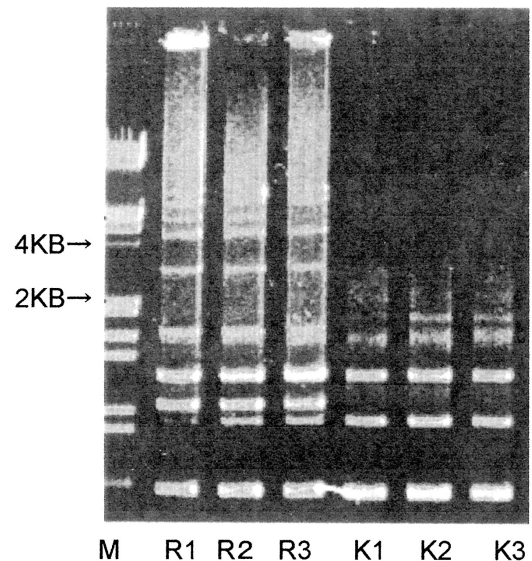


図5. カンアオイ分離菌の*Pot2* rep-PCRフィンガープリントプロフィール  
M: マーカー, R1, R2, R3: イネいもち病菌（対照）  
K1, K2, K3: カンアオイ分離菌（手向）

いスポットが見られた。加えて、メヒシバいもち病菌に特徴的な毒素成分であるピリカラシンHのRf値よりわずかに高い位置に薄い紺色のスポットが検出されるなど、毒素成分についてはイネ菌、メヒシバ菌とは明らかに異なった（図4）。

#### *Pot2* rep-PCR フィンガープリント

カンアオイ分離菌の電気泳動のパターンをみると、イネいもち病菌のバンドパターンとは明らかに異なるが、0.9KBPの遺伝子マーカーをはさんで2本の濃いバンドが増幅され、染色体上に*Pyricularia*属菌にのみ報告されている*Pot2*配列が存在することが確認された（図5）。



## 考 察

カンアオイ (*Asarum nipponicum* F. Maekawa) はわが国固有の植物であり、本州中部以北の山地の林床に生える常緑の多年生草本である。葉身は肉厚の心臓型で、色は濃緑色で白斑や白脈があるものもある。花は秋から初春に株元に半ば地面にうずもれるように咲く。葉柄は暗紫色で多肉質である(牧野, 1975)。カンアオイ (*Asarum nipponicum* F. Maekawa) は庄内地方の山沿いの水田近くの山林の林床に普通に見られる植物であるが、春先に観察すると越冬した葉身にしばしば灰褐色で大きさがまちまちの斑点が認められる。

上記の実験結果から、水田周辺に自生するカンアオイ葉身に形成された褐色の病斑から分離した菌株を、PSA培地で培養すると、灰色の気中菌糸を形成する菌叢が観察された。この菌叢の色調は本病自然発病イネから分離したイネいもち病菌に類似するが、その周縁部はスムーズではなく膨らんだような形状を呈するところはイネいもち病菌のそれとは異なった。オートミール培地では極めてまれに分生孢子が形成されたが、洋ナシ型で2隔壁を持ち、菌形の多分生子柄との着生痕が見られるなどのその特徴的形態とそのサイズが多く、イネ科植物から分離された *Pyricularia* 属菌の記載(八重樫, 1987) とほぼ一致することから、*Pyricularia* 属菌であることが強く示唆された。

病原性試験の結果、この分離菌はカンアオイとイネに病斑を形成せず病原性は確認できなかったが、両植物の接種部位からPSA培地上の形態的特徴において接種菌と区別できない菌が再分離され、イネに対しても感染性を持つことが示唆された。しかし、カンアオイの葉身の病斑上に分生孢子が形成されなかったこと、毒素成分の生成状況などから見てイネ菌やメヒシバ菌とは明らかに異なることからカンアオイ分離菌がイネの伝染源になる可能性は全くないと思われる。逆に、イネ菌はカンアオイに感染性を持たなかったことなどから、カンアオイの葉身上的病斑はイネいもち病菌の感染によるものとも考えにくい。しかし、*Pyricularia* 属菌の染色体にのみ特異的に挿入されている転移因子の一つの *Pot2* (Kachroo et al., 1994) をプライマーにしたPCRで、明瞭なバンドが形成されたことから、分離菌は *Pyricularia* 属菌に属する菌であることは確かである。今回の試験で、地理的に離れた多くの地点に生息するカンアオイ葉身の病斑

から分離を試みた結果、同様の菌が分離されたのは2地点のみであったことから、カンアオイに *Pyricularia* 属菌が生存することは一般的とはいえないまでも、必ずしも珍しいことでもないと思われる。なお、*Pyricularia* 属菌がカンアオイから分離された例は初めての報告である。

春先に病斑を持つカンアオイの葉は、前年の展開葉で越冬した比較的古い葉であることから、可能性として前年に展開葉に感染し、その後組織内で潜在的に生存して、葉組織の加齢に伴い斑点を形成することも考えられる。しかし、カンアオイ葉身上的病斑上には孢子が形成されないことから、本菌はカンアオイ上でのみ生活環を完了させるのではなく、別の植物を宿主として増殖し、いつの時期かに感染し潜在する可能性もあり、菌学的にもきわめて興味深い。

## 摘 要

現在、我が国では環境保全型農業が推進されている。イネいもち病の有効な減農薬の防除法を確立するためには本菌の第一次伝染源の確定や、伝染経路の詳細な把握が重要である。本病の第一次伝染源としてイネ以外の植物も否定できない。そこで、本研究ではイネいもち病のイネ以外の植物における越冬源の探索を目的に、庄内地方の本病常発水田周辺に自生している常緑植物の病斑を中心に探索した。その結果、カンアオイの葉身に形成されていた斑点から組織分離して得た糸状菌の中に、分生孢子の形状から *Pyricularia* 属菌とみられる糸状菌を分離した。また、*Pyricularia* 属菌のみの染色体上に分布する転移因子の一つである *Pot2* が存在することが明らかになったことから *Pyricularia* 属菌に属する菌であることが明らかとなった。しかし、カンアオイからの分離菌はイネに病原性がないこと、培地中に分泌される毒素成分のTLCパターンがイネ菌とは明らかに異なることから、イネいもち病の伝染源とはなりえないと判断した。

## 引用文献

- 古田 力・関口義兼 (1997). いもち病菌の孢子形成法. 植物防疫 21: 160-162.  
George, M.L.C., Nelson, R.J., Zeigler, R.S. and Leung, H. (1998). Rapid population analysis of *Magnaporthe*

- grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequence. *Phytopathology* 88:223-229.
- 糸井節美・野津幹雄・佐藤文雄・山本淳・野田千代・内田利久 (1978). ササ・タケ類に寄生する *Pyricularia* sp.について. 日本植物病理学会報 44 : 209-213.
- Kachroo, P., Leong, S.A. and Chattoo, B.B. (1994). *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Gen. Genet.* 245:339-348.
- 生井恒雄・藤田与一 (2004). イネいもち病常発水田周辺の植物より分離された糸状菌. 日本植物病理学会 70 : 49 (講要).
- 貫名 学 (1998). いもち病菌二次代謝産物一菌の化学分類への利用— 化学と生物 36 (9) : 582-588.
- 牧野富太郎 (1970). 新日本植物図鑑. 北隆館 東京, p. 109.
- 堤加奈子 (2004). ビニール袋に被覆され積雪下で越冬したモミガラの本田におけるいもち病伝染源としての役割. 山形大学大学院農学研究科修士論文 1-85.
- 八重樫博志 (1987). いもち病菌の形態・分類・宿主範囲・イネ以外の植物のいもち病. 稲いもち病「山中 達・山口富夫」編著. 養賢堂. 東京, pp. 22-37.
- 柳澤広宣 (2002). 野外におけるイネいもち病菌の孢子飛散量および系統の季節的变化. 山形大学農学部生物生産学科卒業論文 1-46.
- 吉野嶺一 (1987). 発生生態. 稲いもち病「山中 達・山口富夫」編著. 養賢堂. 東京, pp. 77-98.